CONGEN

SureFood® GMO ID 4plex EU SOYA

Art. No. S2163
100 rxn

User Manual



November 2026

SureFood® GMO ID 4plex EU SOYA (100 rxn)

Art. Nr. S2163

November 2026

Inhalt

1 Allgemeines 3
1.1 Beschreibung 3
1.2 Nachweisgrenze 3
1.3 DNA-Präparation 4
1.4 Kit-Inhalt und Lagerung 4
1.5 Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien 4
1.6 Vorsichtsmaßnahmen 4
1.7 Geräteeinstellungen 5
1.8 Detektionskanaleinstellungen 5
2 Qualitative Analyse 7
2.1 Protokoll 7
2.1.1 Herstellen des Master-Mix 7
2.1.2 Herstellen des real-time PCR-Mix 7
2.2 Interpretation der Ergebnisse 8
3 Grenzen der Methode 11
4 Weitere Informationen 11
4.1 Weitere Dokumente und Hilfsmittel 11
4.2 Technischer Support 11
4.3 Vertrieb und Bestellung 11

Content

1 General Information 12
1.1 Description 12
1.2 Limit of Detection 12
1.3 DNA-preparation 13
1.4 Kit components and storage 13
1.5 Additionally required equipment and materials 13
1.6 Precautions for users 13
1.7 Setup 14
1.8 Detection channel Set-up 14
2 Qualitative Analysis 16
2.1 Protocol 16
2.1.1 Preparation of the master-mix 16
2.1.2 Preparation of the real-time PCR-mix 16
2.2 Interpretation of results 17
3 Limitations of the method 20
4 Further Information 20
4.1 Product Information 20
4.2 Technical Support 20
4.3 Distribution and Ordering 20

1 Allgemeines

1.1 Beschreibung

SureFood® GMO ID 4plex EU SOYA ist eine real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis und zur Differenzierung folgender gentechnisch modifizierter Soja-DNA-Sequenzen in Lebensmitteln, Futtermitteln sowie Saatgut.

- DP-305423 (OECD Bezeichnung DP-3Ø5423-1)
- MON87769 (OECD Bezeichnung MON-87769-7)
- CV127 (OECD Bezeichnung BPS-CV127-9)
- MON87708 (OECD Bezeichnung MON-877Ø8-9)
- MON87701 (OECD Bezeichnung MON-877Ø1-2)
- DAS-44406 (OECD Bezeichnung DAS-444Ø6-6)
- DAS-68416 (OECD Bezeichnung DAS-68416-4)
- FG72 (OECD Bezeichnung MST-FGØ72-2)
- GMB151 (OECD Bezeichnung BCS-GM151-6)
- MON87705 (OECD Bezeichnung MON-877Ø5-6)
- MON87751 (OECD Bezeichnung MON-87751-7)
- DAS-81419 (OECD Bezeichnung DAS-81419-2)
- SYHT0H2 (OECD Bezeichnung SYN-ØØØH2-5)
- MON89788 (OECD Bezeichnung MON-89788-1)
- A2704-12 (OECD Bezeichnung ACS-GMØØ5-3)
- GTS 40-3-2 (OECD Bezeichnung MON-Ø4Ø32-6)
- A5547-127 (OECD Bezeichnung ACS-GMØØ6-4)

Die Nachweise sind angelehnt an den validierten Verfahren der Europäischen Kommission.

Das Nachweisverfahren kann mit allen gängigen real-time PCR Geräten, die mindestens vier Reporterfarbstoffe gleichzeitig in den Kanälen FAM, VIC/HEX, ROX und Cy5 detektieren können, verwendet werden. Die interne technische Geräteverifizierung erfolgte am Roche LightCycler® 480 II, Roche LightCycler® PRO, Qiagen Rotor-Gene Q, Applied Biosystems™ QuantStudio™ 5, Bio-Rad CFX96 Dx und R-Biopharm RIDA®CYCLER.

1.2 Nachweisgrenze

Die SureFood® GMO ID 4plex EU SOYA real-time PCR hat eine Nachweisgrenze von ≤ 5 DNA-Kopien. Das entspricht bei unbehandelten Sojabohnen ca. 0,01 %.

Die Nachweisgrenze des Gesamtverfahrens ist abhängig von Probenmatrix, Prozessierungsgrad, DNA-Präparation und DNA-Gehalt.

Die SureFood® PCR Systeme sind sehr sensitiv. Demzufolge sind bereits sehr geringe Ziel-DNA Gehalte für eine Analyse ausreichend. Über die Bestimmung der Gesamt-DNA in der Probe werden keine Informationen über die Menge und die Qualität an Ziel-DNA erhalten.

Hinweis: Bei Mischproben kann es bei ungleichen Mischungsverhältnissen* zu einem Sensitivitätsverlust in dem Nachweiskanal mit der geringeren Konzentration kommen, besonders wenn in einem Kanal ein Cp-Wert vor 27 erreicht wird.

* z.B. 99,9 % GMB151 und 0,1 % MON89788

1.3 DNA-Präparation

Für die DNA-Präparation wird der SureFood® PREP Basic (Art. Nr. S1052), SureFast® Mag PREP Food (Art. Nr. F1060) und für stark prozessierte Proben wird der SureFood® PREP Advanced (Art. Nr. S1053) empfohlen. Für die DNA-Präparation aus Rohstoffen sowie aus prozessierten Lebens- und Futtermitteln mit 2 g Probeneinwaage wird der SureFood® PREP Add On (Art. Nr. S1055) in Verbindung mit dem SureFood® PREP Basic empfohlen.

1.4 Kit-Inhalt und Lagerung

Kit Code	Reagenz	Menge	Deckelfarbe
1	Reaction Mix	2 x 1050 µl	Gelb
2	Taq Polymerase	1 x 80 µl	Dunkelrot
3	Positive Control	1 x 200 µl	Hellblau

Die Reagenzien sind lichtgeschützt bei –28°C bis -16°C zu lagern. Die Taq Polymerase kann bei mehrfacher Verwendung am selben Tag bei +2 bis +8°C gelagert werden.

Die Reagenzien können bis zum Erreichen des auf den Etiketten aufgedruckten Haltbarkeitsdatums verwendet werden. Ein wiederholtes Einfrieren/Auftauen bis zu 20 Mal beeinträchtigt nicht die Performance.

Hinweis: Die Taq Polymerase kann in gefrorenem oder nicht gefrorenem Zustand vorliegen. Dies hat keinen Einfluss auf die Qualität der Taq Polymerase oder die Performance der real-time PCR.

1.5 Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien

- DNA-Extraktionskit
  (z.B. SureFood® PREP Basic Art. Nr. S1052 / SureFood® PREP Advanced Art. Nr. S1053 / SureFood® PREP Add On Art. Nr. S1055 / SureFast® Mag PREP Food Art. No. F1060)
- Real-time PCR Gerät mit vier Detektionskanälen (510 nm, 580 nm, 610 nm und 660 nm)
- Real-time PCR Verbrauchsmaterialien (Platten, Gefäße, Folien, Deckel)
- Pipetten, Pipettenspitzen mit Filtern
- Einmalhandschuhe, puderfrei
- Vortexmischer
- Mikrozentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäße

1.6 Vorsichtsmaßnahmen

- Eine räumliche Trennung von Extraktion, PCR-Ansatz und PCR ist zu beachten, um Querkontaminationen zu vermeiden.
- Dieser Test ist nur von molekularbiologisch geschultem Laborpersonal durchzuführen.
- Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten.
- Während des Umgangs mit Proben Einmalhandschuhe tragen und nach Abschluss des Tests die Hände waschen.
- In den Bereichen, in denen mit Proben gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.
- Testkit nach Erreichen des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.
- Alle Reagenzien und Materialien müssen nach Gebrauch sachgerecht und eigenverantwortlich entsorgt werden. Bitte beachten Sie bei der Entsorgung die jeweils national geltenden Vorschriften.

1.7 Geräteeinstellungen

	Blockcycler & R-Biopharm RIDA®CYCLER	Rotorcycler
Initial Denaturation (HOLD)	5 min, 95°C	1 min, 95°C
Cycles	45	45
Denaturation	15 sec, 95°C	10 sec, 95°C
Annealing/Extension (CYCLE)	30 sec, 60°C	15 sec, 60°C
Temperature Transition Rate/ Ramp Rate	Maximum	Maximum

1.8 Detektionskanaleinstellungen

Für zusätzliche Informationen wird auf die jeweilige Cycler-Bedienungsanleitung verwiesen.

Real-time PCR Gerät	Nachweis	Detektions -kanal	Quencher	Bemerkung
Applied Biosystems™ QuantStudio™ 5	DP305423, MON87769, CV127, MON87708, MON87701	FAM	+	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none.
	DAS44406, DAS68416, FG72, GMB151	VIC	+	
	MON87705, MON87751, DAS81419, SYHT0H2	ROX	+	
	MON89788, A2704-12, GTS 40-3-2, A5547-127	Cy5	+	
Bio-Rad CFX96/Dx/ Opus	DP305423, MON87769, CV127, MON87708, MON87701	FAM	+	Baseline Einstellungen: • Baseline substracted curve fit • Apply fluorescence drift correction
	DAS44406, DAS68416, FG72, GMB151	VIC/HEX	+	
	MON87705, MON87751, DAS81419, SYHT0H2	ROX	+	
	MON89788, A2704-12, GTS 40-3-2, A5547-127	Cy5	+	
R-Biopharm RIDA®CYCLER	DP305423, MON87769, CV127, MON87708, MON87701	green	+	**Ignore cycles before**, wenn zu Beginn des Laufs eine signifikante Abweichung in der Grundlinie vorliegt. Siehe Seite 47 Bedienungs-anleitung des Cyclers, Abschnitt 12.1.2 Parameter der Cycling-Analyse.
	DAS44406, DAS68416, FG72, GMB151	yellow	+	
	MON87705, MON87751, DAS81419, SYHT0H2	orange	+	
	MON89788, A2704-12, GTS 40-3-2, A5547-127	red	+	

Real-time PCR Gerät	Nachweis	Detektions -kanal	Quencher	Bemerkung
Qiagen Rotor-Gene Q	DP305423, MON87769, CV127, MON87708, MON87701	green	+	**Achtung:** Nur 0,1 ml Reaktionsgefäße verwenden. Die Gain-Einstellungen müssen für alle Kanäle auf 5 (Werkseinstellung) eingestellt sein.
	DAS44406, DAS68416, FG72, GMB151	yellow	+	
	MON87705, MON87751, DAS81419, SYHT0H2	orange	+	
	MON89788, A2704-12, GTS 40-3-2, A5547-127	red	+	
Roche LightCycler® 480 II	DP305423, MON87769, CV127, MON87708, MON87701	465-510	+	Das SureCC Color Compensation Kit I (Art. Nr. F4009) wird benötigt.
	DAS44406, DAS68416, FG72, GMB151	533-580	+	
	MON87705, MON87751, DAS81419, SYHT0H2	533-610	+	
	MON89788, A2704-12, GTS 40-3-2, A5547-127	618-660	+	
Roche Lightcycler® PRO	DP305423, MON87769, CV127, MON87708, MON87701	465-510	+	
	DAS44406, DAS68416, FG72, GMB151	533-580	+	
	MON87705, MON87751, DAS81419, SYHT0H2	533-610	+	
	MON89788, A2704-12, GTS 40-3-2, A5547-127	618-660	+	

2 Qualitative Analyse

2.1 Protokoll

2.1.1 Herstellen des Master-Mix

Die Gesamtzahl der für die PCR benötigten Reaktionen (Proben und Kontrollreaktionen) ist zu berechnen.

Folgende Kontrollen werden benötigt: Negativkontrolle, Extraktionskontrolle, Positive Control und eine externe Inhibitionskontrolle pro Probe.

Für die Durchführung der Inhibitionskontrolle wird die Verwendung des SureFood® GMO Plant PLUS Kits (Art. Nr. S2049) oder des SureFood® GMO SCREEN 4plex 35S/NOS/FMV+IAC (Art. Nr. S2126) empfohlen.

Benötigte Reaktionen für den qualitativen Nachweis:

3 Reaktionen für Kontrollen***** (1x Negativkontrolle, 1x Extraktionskontrolle, 1x Positive Control)

Je Probe: mindestens 1 Reaktion für jede Proben-DNA

Des Weiteren wird empfohlen den Mix mit 10 % zusätzlichem Volumen anzusetzen, um einen Pipettierverlust auszugleichen. Vor der Benutzung die Reagenzien auftauen, mischen und zentrifugieren.

Beispiel für die Berechnung und Herstellung von 10 Reaktionen:

Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10%)
Reaction Mix	19,3 µl	212,3 µl
Taq Polymerase	0,7 µl	7,7 µl
Gesamtvolumen	**20 µl**	**220 µl**

Master-Mix mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

2.1.2 Herstellen des real-time PCR-Mix

- Pipettieren von 20 µl des Master-Mix in das jeweilige Reaktionsgefäß.
- Verschließen der Negativkontrolle.
- Pipettieren von 5 µl der Proben-DNA in die vorgesehenen Reaktionsgefäße. Verschließen der Gefäße.
- Pipettieren von 5 µl Positive Control in die vorgesehenen Reaktionsgefäße. Verschließen der Gefäße.
- Kurzes Zentrifugieren der Reaktionsgefäße mit wenigen Umdrehungen pro Minute.
- Reaktionsgefäße in das real-time PCR Gerät einsetzen und entsprechend der Geräteeinstellungen starten.

*** Beschreibung der einzelnen Kontrollen**

- Negativkontrolle: besteht nur aus dem Master-Mix
- Extraktionskontrolle: die Extraktion wird ohne Probe durchgeführt – Komponenten aus dem verwendeten Prep Kit
- Positive Control: Master-Mix und die im Kit beigefügte Positive Control

2.2 Interpretation der Ergebnisse

Die Auswertung der Ergebnisse wird mit der Analyse Software der jeweiligen real-time PCR Geräte nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die Kontrollreaktionen müssen die korrekten Ergebnisse zeigen (siehe Tabelle).

Im FAM-Kanal werden die Parameter DP305423-, MON87769-, CV127-, MON87708-, MON87701-Soja im VIC/HEX-Kanal die Parameter DAS44406-, DAS68416-, FG72- und GMB151-Soja im ROX-Kanal die Parameter MON87705-, MON87751-, DAS81419-, SYHT0H2-Soja und im Cy5-Kanal der Parameter MON89788-, A2704-12-, GTS 40-3-2-, A5547-127-Soja detektiert (siehe Tabelle).

Eine Probe wird **positiv** für den jeweiligen Parameter bewertet, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation im jeweiligen Kanal zeigt.

Eine Probe wird als **negativ** für den jeweiligen Parameter bewertet, wenn die Proben-DNA keine Amplifikation im jeweiligen Kanal zeigt und die zugehörige externe Inhibitionskontrolle **positiv** mit einer Cp-Abweichung ≤ 2 zur Negativkontrolle ist.

Sollte die Proben-DNA in der externen Inhibitionskontrolle **keine Amplifikation** oder eine Cp-Abweichung > 2 zur Negativkontrolle zeigen, sind in der Proben-DNA Inhibitoren enthalten, die die PCR unterdrücken. Ein starker Abfall des Fluoreszenzsignals kann ebenfalls eine Inhibition anzeigen. In diesen Fällen muss die Isolierung und Reinigung der DNA aus der entsprechenden Probe verbessert werden. Es wird empfohlen den Extraktionsprozess zu wiederholen. Alternativ kann die DNA verdünnt (Empfehlung 1:2 in PCR-Wasser) und wiederholt auf Inhibition getestet werden. Beachten Sie bitte, dass sich die Nachweisgrenze für die Probe im spezifischen Nachweissystem mit dem gewählten Verdünnungsfaktor ändert.

In einigen Fällen kann es vorkommen, dass nur eine der beiden DNA-Duplikate, die aus der Untersuchungsprobe extrahiert wurden **positiv** ist. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Menge an gentechnisch veränderter DNA in der Probe sehr gering ist und an der Nachweisgrenze liegt. Wenn ein solches Ergebnis auch nach mindestens zweimaliger Wiederholung der Analyse vorliegt, wird die Probe als negativ beurteilt.

Ergebnis im jeweiligen Kanal				Ergebnis	Interpretation
FAM-Kanal DP305423, MON87769, CV127, MON87708, MON87701	**VIC/HEX-Kanal** DAS44406, DAS68416, FG72, GMB151	**ROX-Kanal** MON87705, MON87751, DAS81419, SYHT0H2	**Cy5-Kanal** MON89788, A2704-12, GTS 40-3-2, A5547-127	Externe Inhibitions-kontrolle	
positiv	negativ	negativ	negativ	**positiv**	DP305423, MON87769, CV127, MON87708 und/oder MON87701-DNA nachweisbar
negativ	**positiv**	negativ	negativ	**positiv**	DAS44406, DAS68416, FG72 und/oder GMB151-DNA nachweisbar
negativ	negativ	**positiv**	negativ	**positiv**	MON87705, MON87751, DAS81419 und/oder SYHT0H2-DNA nachweisbar
negativ	negativ	negativ	**positiv**	**positiv**	MON89788, A2704-12, GTS 40-3-2 und/oder A5547-127-DNA nachweisbar
negativ	negativ	negativ	negativ	**positiv**	Negativ, Ziel DNA nicht nachweisbar
negativ	negativ	negativ	negativ	negativ	nicht auswertbar

Hinweis: Die in der obenstehenden Tabelle dargestellten Ergebnisse dienen lediglich als Beispiel. Darüber hinaus sind weitere Kombinationen möglich.

Die folgende Tabelle zeigt die Spezifikationsbereiche der Kit Kontrollen

	Spezifikationsbereich
Positive Control (FAM – DP305423, MON87769, CV127, MON87708, MON87701)	25 ≤ Ct ≤ 33
Positive Control (VIC/HEX – DAS44406, DAS68416, FG72, GMB151)	25 ≤ Ct ≤ 33
Positive Control (ROX – MON87705, MON87751, DAS81419, SYHT0H2)	25 ≤ Ct ≤ 33
Positive Control (CY5 – MON89788, A2704-12, GTS 40-3-2, A5547-127)	25 ≤ Ct ≤ 33

Mit dem SureFood® GMO ID 4plex EU SOYA werden bis zu 5 Parameter pro Kanal nachgewiesen. Zur weiteren Differenzierung stehen folgende Kits zur Verfügung:

SureFood® GMO ID 4plex Soya I

- FAM-Kanal: MON87708 Soja (OECD Bezeichnung MON-877Ø8-9)
- FAM-Kanal: CV127 Soja (OECD Bezeichnung BPS-CV127-9)
- VIC-Kanal: DP305423 Soja (OECD Bezeichnung DP-3Ø5423-1)
- ROX-Kanal: MON87701 Soja (OECD Bezeichnung MON877Ø1-2)
- Cy5-Kanal: MON87769 Soja (OECD Bezeichnung MON-87769-7)

SureFood® GMO ID 4plex Soya II

- FAM-Kanal: Roundup Ready Soja (RR Soya) (OECD Bezeichnung MON-Ø4Ø32-6)
- VIC-Kanal: Roundup Ready 2 Yield Soja (RR2Y Soja) (OECD Bezeichnung MON-89788-1)
- ROX-Kanal: A2704-12 Soja (OECD Bezeichnung ACS-GMØØ5-3)
- Cy5-Kanal: A5547-127 Soja (OECD Bezeichnung ACS-GMØØ6-4)

SureFood® GMO ID 4plex Soya III

- FAM-Kanal: FG72 Soja (OECD Bezeichnung MST-FGØ72-2)
- VIC-Kanal: DAS68416 Soja (OECD Bezeichnung DAS-68416-4)
- ROX-Kanal: GMB151 Soja (OECD Bezeichnung BCS-GM151-6)
- Cy5-Kanal: DAS44406 Soja (OECD Bezeichnung DAS-444Ø6-6)

SureFood® GMO ID 4plex Soya IV

- FAM-Kanal: MON87705 Soja (OECD Bezeichnung MON-877Ø5-6)
- VIC-Kanal: DAS-81419-2 Soja (OECD Bezeichnung DAS-81419-2)
- ROX-Kanal: MON87751 Soja (OECD Bezeichnung MON-87751-7)
- Cy5-Kanal: SYHT0H2 Soja (OECD Bezeichnung SYN-ØØØH2-5)

3 Grenzen der Methode

- Die Anwesenheit von PCR-Inhibitoren kann zu nicht auswertbaren Ergebnissen führen.
- Äußerst niedrige Konzentrationen der Zielsequenzen, die unter dem Detektionslimit (LoD) liegen, können zu nicht reproduzierbaren Ergebnissen führen.
- Bei stark prozessierten Proben kann es zu einer Verschiebung der Nachweisgrenze kommen. Faktoren wie hohe Drücke, mechanischen Belastungen, chemische Behandlung, extreme Temperaturen und/oder extreme pH-Werte während des Verarbeitungsprozesses – wie z B. bei der Konservenherstellung – können Nukleinsäuren beschädigen oder abbauen. Das bedeutet, dass die Empfindlichkeit des Testkits verringert sein kann und möglicherweise nicht alle ursprünglichen Bestandteile erfasst werden.

4 Weitere Informationen

4.1 Weitere Dokumente und Hilfsmittel

- Detaillierte Informationen zur Einstellung bestimmter real-time PCR Geräte (Download: www.congen.de/unternehmen/download)
- Produktbegleitende Unterlagen (Download: www.congen.de/eifu/)
- Validation Report auf Anfrage

4.2 Technischer Support

Bei Fragen zur Durchführung wenden sie sich bitte an Ihren Distributor oder per E-Mail an sales@r-biopharm.de.

4.3 Vertrieb und Bestellung

R-Biopharm AG
An der neuen Bergstrasse 17,
64297 Darmstadt, Germany
Phone: +49 (0) 61 51 - 81 02-0
Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-20
E-Mail: orders@r-biopharm.de
www.r-biopharm.com

1 General Information

1.1 Description

The SureFood® GMO ID 4plex EU SOYA is a real-time PCR for the direct, qualitative detection and differentiation of following specific genetically modified soya DNA sequences in food, feed and seeds.

- DP-305423 (OECD unique identifier DP-3Ø5423-1)
- MON87769 (OECD unique identifier MON-87769-7)
- CV127 (OECD unique identifier BPS-CV127-9)
- MON87708 (OECD unique identifier MON-877Ø8-9)
- MON87701 (OECD unique identifier MON-877Ø1-2)
- DAS-44406 (OECD unique identifier DAS-444Ø6-6)
- DAS-68416 (OECD unique identifier DAS-68416-4)
- FG72 (OECD unique identifier MST-FGØ72-2)
- GMB151 (OECD unique identifier BCS-GM151-6)
- MON87705 (OECD unique identifier MON-877Ø5-6)
- MON87751 (OECD unique identifier MON-87751-7)
- DAS-81419 (OECD unique identifier DAS-81419-2)
- SYHT0H2 (OECD unique identifier SYN-ØØØH2-5)
- MON89788 (OECD unique identifier MON-89788-1)
- A2704-12 (OECD unique identifier ACS-GMØØ5-3)
- GTS 40-3-2 (OECD unique identifier MON-Ø4Ø32-6)
- A5547-127 (OECD unique identifier ACS-GMØØ6-4)

The detections are according to the validated method of the European Commission.

The real-time PCR assay can be performed with commonly used real-time PCR instruments, equipped for detection of four fluorescence emissions at the channels FAM, VIC/HEX, ROX and Cy5 at the same time. The internal technical verification of instruments was performed on Roche LightCycler® 480 II, Roche LightCycler® PRO, Qiagen Rotor-Gene Q, Applied Biosystems™ QuantStudio™ 5, Bio-Rad CFX96 Dx and R-Biopharm RIDA®CYCLER.

1.2 Limit of Detection

The SureFood® GMO ID 4plex EU SOYA real-time PCR has a limit of detection of ≤ 5 DNA copies. This is equivalent to approx. 0.01 % for unprocessed soybean.

The assay limit of detection depends on sample matrix, processing grade, DNA preparation and DNA content.

The SureFood® PCR systems are very sensitive and therefore even a small amount of target DNA is sufficient for a successful analysis. The concentration of total DNA in the sample does not allow a conclusion on the quantity and quality of the target DNA.

Note: Inconsistent mixing ratios* may cause a loss of sensitivity in the low concentration channel in mixed samples especially with high amplicon concentrations (Cp value < 27).

* e.g. 99.9 GMB151 and 0.1 % MON89788

1.3 DNA-preparation

For DNA-preparation of raw material the use of SureFood® PREP Basic (Art. No. S1052), SureFast® Mag PREP Food (Art. No. F1060) and for highly processed food and feed the use of SureFood® PREP Advanced (Art. No. S1053) is recommended. SureFood® PREP Add On (Art. No. S1055) is intended to be used for the extraction of DNA from raw materials as well as processed food and feed with sample weight of 2 g. It is used in conjunction with the SureFood® PREP Basic.

1.4 Kit components and storage

Kit Code	Reagent	Amount	Lid Color
1	Reaction Mix	2 x 1050 µl	Yellow
2	Taq Polymerase	1 x 80 µl	Dark Red
3	Positive Control	1 x 200 µl	Light Blue

Store all reagents at –28°C to -16°C and protected from light. The Taq Polymerase can be stored at +2 to +8°C for multiple uses on the same day.

Reagents should be used until the expiration date indicated on the label. Reagents can sustain up to 20 freeze/thaw cycles without influencing the assay performance.

Note: The Taq Polymerase may be in a frozen or unfrozen state. This does not affect the quality of the Taq Polymerase or the performance of the real-time PCR.

1.5 Additionally required equipment and materials

- DNA-Extraction kit
  (e.g. SureFood® PREP Basic Art. No. S1052 / SureFood® PREP Advanced Art. No. S1053 / SureFood® PREP Add On Art. No. S1055 / SureFast® Mag PREP Food Art. No. F1060
- real- time PCR instrument with four detection channels (510 nm, 580 nm, 610 nm and 660 nm)
- real-time PCR consumable (plates, tubes, foils, caps)
- pipettes with filter tips
- powder-free disposable gloves
- Vortex mixer
- micro centrifuge with a rotor for the reaction tubes

1.6 Precautions for users

- Extraction, PCR preparation and the PCR run should be separated in different rooms to avoid cross-contaminations.
- This test must only be performed by laboratory personnel trained in molecular biology methods.
- Strictly follow the working instructions.
- When handling samples, wear disposable gloves. After finishing the test, wash your hands.
- Do not smoke, eat or drink in areas where samples or test reagents are being used.
- Do not use the kit after the expiration date.
- All reagents and materials used have to be disposed properly after use. Please refer to the relevant national regulation for disposal.

1.7 Setup

	Blockcycler & R-Biopharm RIDA®CYCLER	Rotorcycler
Initial Denaturation (HOLD)	5 min, 95°C	1 min, 95°C
Cycles	45	45
Denaturation	15 sec, 95°C	10 sec, 95°C
Annealing/Extension (CYCLE)	30 sec, 60°C	15 sec, 60°C
Temperature Transition Rate/ Ramp Rate	Maximum	Maximum

1.8 Detection channel Set-up

For additional details see cycler operating instructions for real-time PCR device.

Real-time PCR device	Detection	Detection channel	Quencher	Note
Applied Biosystems™ QuantStudio™ 5	DP305423, MON87769, CV127, MON87708, MON87701	FAM	+	Check the passive reference option ROX is none.
	DAS44406, DAS68416, FG72, GMB151	VIC	+	
	MON87705, MON87751, DAS81419, SYHT0H2	ROX	+	
	MON89788, A2704-12, GTS 40-3-2, A5547-127	Cy5	+	
Bio-Rad CFX96/Dx/Opus	DP305423, MON87769, CV127, MON87708, MON87701	FAM	+	Baseline Settings: • Baseline substracted curve fit • Apply fluorescence drift correction
	DAS44406, DAS68416, FG72, GMB151	VIC/HEX	+	
	MON87705, MON87751, DAS81419, SYHT0H2	ROX	+	
	MON89788, A2704-12, GTS 40-3-2, A5547-127	Cy5	+	
R-Biopharm RIDA®CYCLER	DP305423, MON87769, CV127, MON87708, MON87701	green	+	**Ignore cycles before**, if there is a significant deviation in the baseline at the start of the run. Please see page 45 of the cycler operating instructions, section 12.1.2 Cycling analysis parameter.
	DAS44406, DAS68416, FG72, GMB151	yellow	+	
	MON87705, MON87751, DAS81419, SYHT0H2	orange	+	
	MON89788, A2704-12, GTS 40-3-2, A5547-127	red	+	

Real-time PCR device	Detection	Detection channel	Quencher	Note
Qiagen Rotor-Gene Q	DP305423, MON87769, CV127, MON87708, MON87701	green	+	**Note:** Please use only 0.1 ml reaction tube. The gain settings must be set to 5 (factory default) for all channels.
	DAS44406, DAS68416, FG72, GMB151	yellow	+	
	MON87705, MON87751, DAS81419, SYHT0H2	orange	+	
	MON89788, A2704-12, GTS 40-3-2, A5547-127	red	+	
Roche LightCycler® 480 II	DP305423, MON87769, CV127, MON87708, MON87701	465-510	+	The SureCC Color Compensation Kit I (Art. No. F4009) is required.
	DAS44406, DAS68416, FG72, GMB151	533-580	+	
	MON87705, MON87751, DAS81419, SYHT0H2	533-610	+	
	MON89788, A2704-12, GTS 40-3-2, A5547-127	618-660	+	
Roche LightCycler® PRO	DP305423, MON87769, CV127, MON87708, MON87701	465-510	+	
	DAS44406, DAS68416, FG72, GMB151	533-580	+	
	MON87705, MON87751, DAS81419, SYHT0H2	533-610	+	
	MON89788, A2704-12, GTS 40-3-2, A5547-127	618-660	+	

2 Qualitative Analysis

2.1 Protocol

2.1.1 Preparation of the master-mix

Calculate the total number of reactions needed (samples and control reactions) for the specific PCR assay as well as for the inhibition control.

The following control reactions are needed for the specific PCR assay: negative control, extraction control, Positive Control and an external inhibition control per sample.

For the preparation of the inhibition control, it is recommended to use the SureFood® GMO Plant PLUS (Art. No. S2049) or the SureFood® GMO SCREEN 4plex 35S/NOS/FMV+IAC (Art. No. S2126).

Reactions needed for the qualitative detection:

3 reactions for controls***** (1x negative control, 1x extraction control, 1x Positive Control)

For each sample: at least 1 reaction for each sample DNA

It is also recommended to prepare the master-mix with 10 % additional volume in order to compensate reagent loss. Allow the reagents to thaw, mix and centrifuge before opening and use.

Example for the calculation and preparation of 10 reactions:

Components of the master-mix	Amount per reaction	10 reactions (with 10% excess)
Reaction Mix	19.3 µl	212.3 µl
Taq Polymerase	0.7 µl	7.7 µl
Total volume	**20 µl**	**220 µl**

Mix each master-mix well and centrifuge shortly before use.

2.1.2 Preparation of the real-time PCR-mix

- Pipette 20 µl of the master-mix into appropriate tubes/wells.
- Close the negative control.
- Pipette 5 µl of sample DNA into the designated tubes/wells and close them.
- Pipette 5 µl of Positive Control into the designated tubes/wells and close them.
- Centrifuge all tubes/plates shortly at low speed.
- Place tubes/plates into the real-time PCR instrument and start the run according to the setup.

*** Description of the controls**

- Negative control: only master-mix
- Extraction control: the extraction is performed without the sample –components from used Prep Kit
- Positive Control: master-mix and within the kit's provided Positive Control

2.2 Interpretation of results

The evaluation has to be made according to the usual analysis program recommended by the real-time PCR instrument manufacturer.

The control reactions have to show the correct results, see table 2.

DP305423, MON87769, CV127, MON87708 and MON87701 DNA is detected in the FAM-channel, DAS44406, DAS68416, FG72 and GMB151 DNA is detected in the VIC/HEX -channel, MON87705, MON87751, DAS81419 and SYHT0H2 DNA is detected in the ROX-channel and MON89788, A2704-12, GTS 40-3-2 and A5547-127 DNA is detected in the Cy5-channel (see table).

A sample is stated **positive** for the respective parameter, if the sample DNA shows amplification in the respective channel.

A sample is stated **negative** for the respective parameter, if the sample DNA shows no amplification in the respective channel and if the external inhibition control of the sample is **positive** with a shift in Cp-value ≤ 2 compared to the negative control.

If the sample DNA in the external inhibition control shows **no amplification** or a shift in Cp-value > 2 compared to the negative control, it contains PCR inhibiting substances. A significant decrease in the fluorescence signal can also show the presence of PCR inhibiting substances. Under these circumstances DNA isolation and purification of the sample need to be improved. It is recommended to repeat the extraction process. Alternatively the DNA can be diluted (recommendation 1:2 in PCR-water) and analysed again for inhibition. Please note that the dilution factor also affects the detection limit of the specific PCR assay.

It may appear in some cases that only one of the two DNA duplicates prepared from the test sample is **positive**. This indicates that the amount of genetically modified DNA is very low and at the limit of detection. If such results are obtained in at least two repetitions of the analysis, the sample is stated negative.

Result in the respective channel				Result	Interpretation
FAM channel DP305423, MON87769, CV127, MON87708, MON87701	**VIC/HEX channel** DAS44406, DAS68416, FG72, GMB151	**ROX channel** MON87705, MON87751, DAS81419, SYHT0H2	**Cy5 channel** MON89788, A2704-12, GTS 40-3-2, A5547-127	external inhibition-control	
positive	negative	negative	negative	**positive**	DP305423, MON87769, CV127, MON87708 and/or MON87701 DNA detected
negativ	**positive**	negative	negative	**positive**	DAS44406, DAS68416, FG72 and/or GMB151 DNA detected
negativ	negative	**positive**	negative	**positive**	MON87705, MON87751, DAS81419 and/or SYHT0H2 DNA detected
negativ	negative	negative	**positive**	**positive**	MON89788, A2704-12, GTS 40-3-2 and/or A5547-127 DNA detected
negativ	negative	negative	negative	**positive**	Negative, no target DNA detected
negativ	negative	negative	negative	negative	invalid

Note: The results displayed in the table above represent merely an example. Additional combinations are also possible.

The following table shows the specification ranges of the kit controls

	Specification range
Positive Control (FAM – DP305423, MON87769, CV127, MON87708, MON87701)	25 ≤ Ct ≤ 33
Positive Control (VIC – DAS44406, DAS68416, FG72, GMB151)	25 ≤ Ct ≤ 33
Positive Control (ROX – MON87705, MON87751, DAS81419, SYHT0H2)	25 ≤ Ct ≤ 33
Positive Control (CY5 – MON89788, A2704-12, GTS 40-3-2, A5547-127)	25 ≤ Ct ≤ 33

The SureFood® GMO ID 4plex EU SOYA kit allows the detection of up to 5 parameters per channel. The following kits are available for further differentiation:

SureFood® GMO ID 4plex Soya I

- FAM channel: MON87708 soya (OECD unique identifier MON-877Ø8-9)
- FAM channel: CV127 soya (OECD unique identifier BPS-CV127-9)
- VIC channel: DP305423 soya (OECD unique identifier DP-3Ø5423-1)
- ROX channel: MON87701 soya (OECD unique identifier MON877Ø1-2)
- Cy5 channel: MON87769 soya (OECD unique identifier MON-87769-7)

SureFood® GMO ID 4plex Soya II

- FAM channel: Roundup Ready soya (RR Soya) (OECD unique identifier MON-Ø4Ø32-6)
- VIC channel: Roundup Ready 2 Yield soya (RR2Y Soya) (OECD unique identifier MON-89788-1)
- ROX channel: A2704-12 soya (OECD unique identifier ACS-GMØØ5-3)
- Cy5 channel: A5547-127 soya (OECD unique identifier ACS-GMØØ6-4)

SureFood® GMO ID 4plex Soya III

- FAM channel: FG72 soya (OECD unique identifier MST-FGØ72-2)
- VIC channel: DAS68416 soya (OECD unique identifier DAS-68416-4)
- ROX channel: GMB151 soya (OECD unique identifier BCS-GM151-6)
- Cy5 channel: DAS44406 soya (OECD unique identifier DAS-444Ø6-6)

SureFood® GMO ID 4plex Soya IV

- FAM channel: MON87705 soya (OECD unique identifier MON-877Ø5-6)
- VIC channel: DAS-81419-2 soya (OECD unique identifier DAS-81419-2)
- ROX channel: MON87751 soya (OECD unique identifier MON-87751-7)
- Cy5 channel: SYHT0H2 soya (OECD unique identifier SYN-ØØØH2-5)

3 Limitations of the method

- The presence of PCR inhibitors may cause invalid results.
- Extremly low levels of target below the limit of detection (LoD) may be detected, but results may not reproducible.
- In highly processed samples, the detection limit may be shifted. Factors such as high pressures, mechanical stresses, chemical treatment, extreme temperatures and/or extreme pH values during manufacturing process – such as in canning production – can damage or degrade nucleic acids. This means that the sensitivity of the test kit may be reduced and not all original components may be detected.

4 Further Information

4.1 Product Information

- Detailed information about setup of several real-time PCR devices (Download: www.congen.de/en/company/downloads)
- Product-related documents (Download: www.congen.de/en/eifu/)
- Validation Report upon request

4.2 Technical Support

For further questions please contact your distributor or send an e-mail to sales@r-biopharm.de.

4.3 Distribution and Ordering

R-Biopharm AG
An der neuen Bergstrasse 17,
64297 Darmstadt, Germany
Phone: +49 (0) 61 51 - 81 02-0
Fax: +49 (0) 61 51 - 81 02-20
E-Mail: orders@r-biopharm.de
www.r-biopharm.com